

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-39389

(43) 公開日 平成7年(1995)2月10日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 23/00		9452-4B		
// (C 1 2 P 23/00				
C 1 2 R 1:89)				

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平5-190458

(22) 出願日 平成5年(1993)7月30日

(71) 出願人 000112048

ヒガシマル醤油株式会社

兵庫県龍野市龍野町富永100番地の3

(72) 発明者 古林 万木夫

兵庫県龍野市揖西町田井164

(72) 発明者 辻 安信

兵庫県揖保郡揖保川町神戸北山223-88

(72) 発明者 柿園 俊英

広島県東広島市西条町下三永354-151

(72) 発明者 永井 史郎

広島県広島市西区己斐本町3丁目1-6-1101

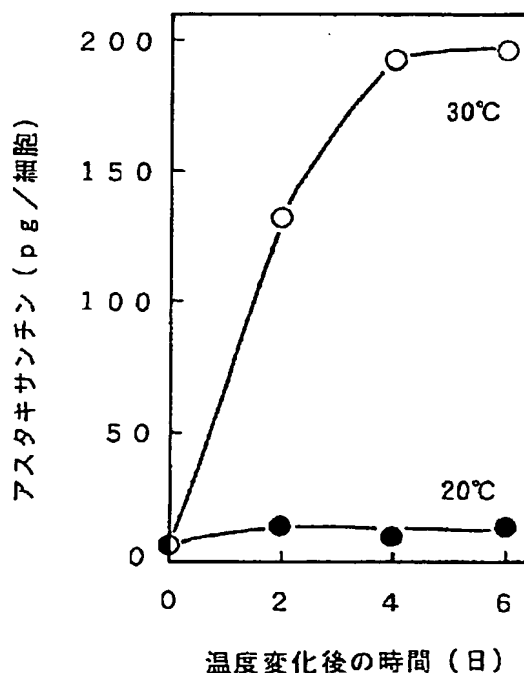
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

(54) 【発明の名称】 アスタキサンチンの製造方法

(57) 【要約】

【目的】 緑藻ヘマトコッカス・ブルビアリスの培養方法を改善することによってアスタキサンチン含有量を短期間で増加させ、効率よくアスタキサンチンを製造する方法、特に、ヘマトコッカス・ブルビアリスに温度ストレスを加えて培養することを含む、アスタキサンチンの製造方法を提供する。

【構成】 ヘマトコッカス・ブルビアリスを温度ストレス下で培養することにより、アスタキサンチン生産を伴うシスト化を誘発させ、さらに、温度ストレスを加え、同時、その前、および/またはその後、活性酸素生成物質と炭素源を培養基に添加することによりヘマトコッカス・ブルビアリスのアスタキサンチン生産を促進させ、該培養物からアスタキサンチンを採取する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヘマトコッカス・ブルビアリスに、温度ストレスを加えることにより、シスト化を誘発してアスタキサンチン生産を促進させ、該培養物からアスタキサンチンを採取する工程を包含する、アスタキサンチンの製造方法。

【請求項2】 ヘマトコッカス・ブルビアリスに、温度ストレスを加え、同時、その前、および／またはその後に、活性酸素生成物質および炭素源を培養基に添加して、アスタキサンチン生産を促進させ、該培養物からアスタキサンチンを採取する工程を包含する、アスタキサンチンの製造方法。

【請求項3】 前記温度ストレスが、ヘマトコッカス・ブルビアリスを生育温度 $T_1$ にて培養し、得られた栄養細胞を次いで色素生産温度 $T_2$ にて培養する方法であって、該生育温度 $T_1$ が15～28℃であり、該色素生産温度 $T_2$ が25～38℃であり、該色素生産温度 $T_2$ が該生育温度 $T_1$ より10～15℃の範囲で高温である、請求項1または請求項2に記載のアスタキサンチンの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、緑藻ヘマトコッカス・ブルビアリスから大量に効率よくアスタキサンチンを得る、アスタキサンチンの製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】アスタキサンチンは、甲殻類、魚類などの水産生物に含まれる赤色カロチノイド色素で、これらの生物の肉色や体色の発現に深く関与している。ファフィア・ロドチーマのようなアスタキサンチンを含む赤色酵母の菌体を、マダイ、ニジマス、サケなどの養殖魚の発色飼料として、南極オキアミなどに代替される用途が検討されている（特公昭63-61907号公報）。また、アスタキサンチンに $\alpha$ -トコフェロールよりもはるかに強力な抗酸化作用があることがわかり、医薬活性成分としての用途も検討されている（Miki, Pure Appl. Chem., 63, 141 (1991)）。

【0003】緑藻ヘマトコッカス・ブルビアリスもアスタキサンチンを含有するが、効率よくアスタキサンチン含有量を増加させるための詳細な培養条件については、よく知られていない。このため生産性や品質が不十分であり、優れた飼料価値や医薬品素材としての潜在価値を有しながら、有効利用されるに至っていない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、緑藻ヘマトコッカス・ブルビアリスの培養方法を改善することによってアスタキサンチン含有量を早期に増加させ、効率よくアスタキサンチンを製造する方法、特にヘマトコッカス・ブルビアリスに温度ストレスを加えて培養することを含むアスタキサンチンの製造方法を提供することを目

的としている。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、緑藻ヘマトコッカス・ブルビアリスによるアスタキサンチンの生産方法について検討を重ねた結果、ヘマトコッカス・ブルビアリスに温度ストレスを加えることによってシスト化が誘発され、アスタキサンチン生産が促進されることを見いだした。さらに、温度ストレスを加え、同時、その前、および／またはその後に、培養基に活性酸素生成物質と炭素源を添加することによりアスタキサンチン生産が著しく促進されることも見いだした。これらの知見に基づいて本発明を成すに至った。

【0006】本発明のアスタキサンチンの製造方法は、ヘマトコッカス・ブルビアリスに、温度ストレスを加えることにより、シスト化を誘発してアスタキサンチン生産を促進させ、該培養物からアスタキサンチンを採取する工程を包含する。

【0007】本発明のアスタキサンチンの製造方法は、ヘマトコッカス・ブルビアリスに、温度ストレスを加え、同時、その前、および／またはその後に、活性酸素生成物質および炭素源を培養基に添加して、アスタキサンチン生産を促進させ、該培養物からアスタキサンチンを採取する工程を包含する。

【0008】好適な実施態様においては、上記温度ストレスは、ヘマトコッカス・ブルビアリスを生育温度 $T_1$ にて培養し、得られた栄養細胞を次いで色素生産温度 $T_2$ にて培養する方法であって、該生育温度 $T_1$ が15～28℃であり、該色素生産温度 $T_2$ が25～38℃であり、該色素生産温度 $T_2$ が該生育温度 $T_1$ より10～15℃の範囲で高温である。

【0009】本発明に用いる緑藻ヘマトコッカス・ブルビアリスは、単細胞で細胞の大きさは20～25 $\mu$ mであり、淡水に生息するプランクトンであって、容易に採取することができる。例えば、Haematococcus pluvialis ASIB BS2, CALU 9, CALU 333, CAUP G1002, CCAO, IB ASU 38, IPPAS H-23, MUR 01,02,62,63,64,65,66,67,68,69,71,72,75,76,77, NIES 144, NIVA CHL 9, SMBA がある。Haematococcus lacustris の中にはヘマトコッカス・ブルビアリスと同一のものもあり、このような同一のものとして ATCC 30402, SAG 34-1a,1b,1c,1d,1e,1f, 1h 1k,1l,1m 1n, UTEX 16 がある。本発明に好適に用いられるヘマトコッカス・ブルビアリスは国立環境研(NIES)に寄託番号NIES144として寄託されている。

【0010】緑藻ヘマトコッカス・ブルビアリスの栄養細胞は、窒素源が欠乏した培養基に移すことにより、アスタキサンチンを大量に含有するシストを形成する。このアスタキサンチン生産を伴うシスト化は、高い炭素／窒素比によって誘導されるため、人為的に培養基中の成分組成を適当に調節することにより、栄養細胞からシス

トへの形態変化を誘導することができる (Kakizonoら, J. Ferment. Bioeng., 74, 403 (1992))。

【0011】ヘマトコッカス・ブルビアリスのシスト細胞ではアスタキサンチン生産は活性酸素生成物質により促進されるが、強力な抗酸化作用を有するアスタキサンチンは、様々な酸化的ストレスに対する防御機構の一つとして機能していると考えられる (Kobayashiら, Appl. Environ. Microbiol., 59, 867 (1993))。

【0012】ヘマトコッカス・ブルビアリスの栄養細胞は、暗所で酢酸などの有機物を炭素源として従属栄養的に培養するだけでなく、明所で炭酸ガスを炭素源として独立栄養的に、あるいは明所で酢酸などの有機物と炭酸ガスの両方を炭素源として混合栄養的に増殖させることができる (Kobayashiら, J. Ferment. Bioeng., 74, 17 (1992))。

【0013】本発明で使用される栄養培地は、通常のものでよく、炭素源としては、例えば、従来から知られている酢酸のほか、ビルビン酸、エタノール、およびTCA関連有機酸などがある。上記の各々の炭素源と、アスパラギン、グリシン、グルタミンなどのアミノ酸のような窒素源とを含む群の中から選ばれる1種または2種以上に、さらに酵母エキスを組み合わせた培地が用いられる。好ましい培地は、例えば酵母エキス2.0g/l、酢酸ナトリウム1.2g/l、L-アスパラギン0.4g/l、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  985  $\mu M$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  36  $\mu M$ 、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  136  $\mu M$ 、pH6.8である。培養条件としては、光照射強度は、1000~10000ルクスの範囲とする。生育温度は菌株により異なるが、通常、15~28℃である。

【0014】このようにして培養したヘマトコッカス・ブルビアリスは、人為的に培養基中の成分組成を適当に調節することにより、栄養細胞からシストへの形態変化を誘導して、蓄積するアスタキサンチンを採取することも可能である。しかしながら、ヘマトコッカス・ブルビアリスの培養温度を高温条件に移すことにより、栄養細胞からシストへの形態変化を誘導して、アスタキサンチン生産機能を最大限に引き出すことはより効果が高い。したがって、ヘマトコッカス・ブルビアリスの至適生育温度 $T_1$ より10~15℃高い培養温度(色素生産温度 $T_2$ )に栄養細胞を移し、光照射下で、栄養細胞からシストへの形態変化を誘導して、アスタキサンチン生産を促進させる。あるいは、至適生育温度 $T_1$ より10~15℃高い培養温度(色素生産温度 $T_2$ )に栄養細胞を移し、同時、その前、および/またはその後に、活性酸素生成物質と炭素源を培養基に添加することにより、アスタキサンチン生産を著しく増強させることができる。用いられる活性酸素生成物質には、例えば、鉄イオン、メチレンブルー、メチルピオロゲン、過酸化水素などがある (特開平5-68585号公報)。使用される炭素源としては、上記のものがいずれも用いられ、好ましくは

酢酸を使用する。

【0015】温度ストレスとして与えられる色素生産温度 $T_2$ は、至適生育温度 $T_1$ に対し、10~15℃の範囲にわたって高いことが必要である。したがって、生育温度 $T_1$ で培養し得られた栄養細胞をシスト化し、アスタキサンチン生産を促進するための色素生産温度 $T_2$ は、25~38℃に設定され、好ましくは30℃に設定する。

【0016】上記の温度ストレス条件下での培養方法は、培養因子の中で最もコントロールしやすい培養温度によって、ヘマトコッカス・ブルビアリスのアスタキサンチン生産を容易に促進することができる。

【0017】ヘマトコッカス・ブルビアリス細胞の破碎には、プロテアーゼを用いる酵素的な方法 (特開平5-68585号公報) だけでなく、ガラスビーズを加えグライディングにより破碎する方法、あるいはフレンチプレスを用いる方法、さらには超音波破碎法などの既知の物理的方法を適用し、メタノールあるいはアセトンなどの極性の大きい溶媒で抽出することにより回収することができる。また、細胞をバルクのままで養殖魚の色揚げなどに使用することもできる。

【0018】アスタキサンチンの精製は、既知の分離精製手段を適宜利用することによって、所望の純度のアスタキサンチンを得ることができる。

【0019】

【実施例】次に、酢酸を炭素源とした実施例によって、本発明を更に詳細に説明する。

【0020】実施例1

表1に示す培養基100mlを200ml容のフラスコに入れ、121℃で、15分間滅菌した。維持用の培養基に別に培養したヘマトコッカス・ブルビアリス (*Haematococcus pluvialis* NIES 144) のシードを接種し、1500ルクスの光照射度下、生育温度20℃で4日間培養を行った。

【0021】上記培養で得られたヘマトコッカス・ブルビアリスの栄養細胞を、色素生産温度30℃で6日間本培養した。

【0022】本培養における、ヘマトコッカス・ブルビアリスのカロチノイド含量の変化を図1に示す。カロチノイド量は480nmでの吸光度から測定した後、抽出し、その90%がアスタキサンチンであることを確認した。

【0023】ヘマトコッカス・ブルビアリスの栄養細胞を20℃で培養すれば、そのまま栄養増殖を行うが、培養温度を生育温度である20℃から、色素生産温度である30℃に急激に変化させると、シスト細胞への形態変化が起こり、アスタキサンチン生産が促進された。アスタキサンチン含量は栄養細胞の約20倍であった。

【0024】

【表1】

5

酵母エキス	2.0 g/l
酢酸ナトリウム	1.2 g/l
L-アスパラギン	0.4 g/l
MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	985 μM
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	36 μM
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	136 μM
pH	6.8

## 【0025】実施例2

実施例1と同様にして得られた栄養細胞に、炭素源として酢酸濃度が45mM、鉄イオン濃度(FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O)が450μMとなるように添加し、色素生産温度30℃でさらに6日間培養した。アスタキサンチン量は、実施例1と同様にして測定した。ヘマトコッカス・ブルビアリスの栄養細胞は、培養温度を高温の色素生産温度(30℃)に変化させることにより、シストの形成を開始し、細胞内にアスタキサンチンを蓄積する(図1)。さらに、温度ストレス下(30℃)で、炭素源である酢酸と鉄イオンを添加すると、アスタキサンチン生産は著しく促進された(図2)。

\*

6

\*【0026】このように、ヘマトコッカス・ブルビアリスの栄養細胞に、温度ストレスを加えることにより、アスタキサンチン生産を伴うシスト化を引き起こすことができた。さらに、温度ストレスを加え、同時、その前、および/またはその後に、培養基に酢酸と鉄イオンを添加することにより、アスタキサンチンを大量に細胞内に蓄積させることができた。アスタキサンチン含量は栄養細胞の約60倍となった。

【0027】

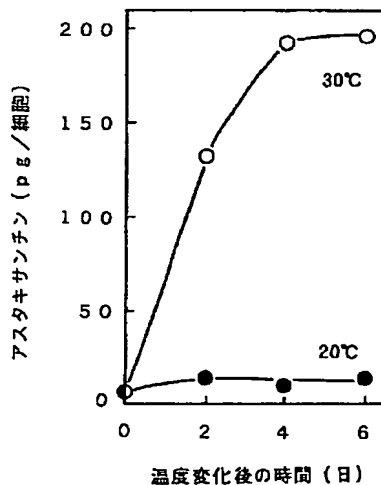
- 10 【発明の効果】本発明によれば、藻体中にアスタキサンチンが早期から蓄積し、さらに、人工的なシスト誘導により、効率よくアスタキサンチンを生産させることができる。これよりアスタキサンチンを大量に効率よく製造する方法が提供される。得られるアスタキサンチンは安全性が高いので、魚類養殖その他の産業に寄与し得る。

【図面の簡単な説明】

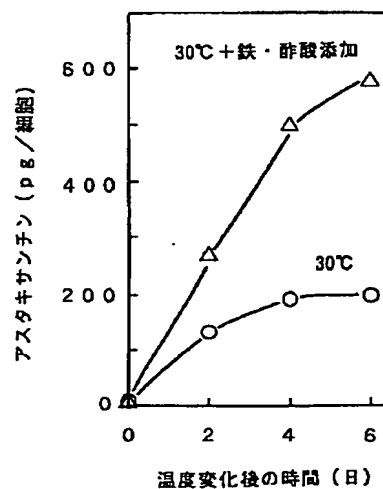
【図1】ヘマトコッカス・ブルビアリスの、カロチノイド生産に対する温度の効果を示す。

【図2】温度ストレス下で、ヘマトコッカス・ブルビアリスの、カロチノイド生産に対する鉄イオンおよび酢酸添加の効果を示す。

【図1】



【図2】



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
【部門区分】第1部門第1区分  
【発行日】平成13年1月9日(2001. 1. 9)

【公開番号】特開平7-39389  
【公開日】平成7年2月10日(1995. 2. 10)  
【年通号数】公開特許公報7-394  
【出願番号】特願平5-190458  
【国際特許分類第7版】

C12P 23/00  
/(C12P 23/00  
C12R 1:89 )  
【F I】  
C12P 23/00

【手続補正書】  
【提出日】平成12年6月8日(2000. 6. 8)  
【手続補正1】  
【補正対象書類名】明細書  
【補正対象項目名】特許請求の範囲  
【補正方法】変更  
【補正内容】  
【特許請求の範囲】

【請求項1】ヘマトコッカス・ブルビアリスに、シスト化を誘発するのに十分な温度ストレスを加える工程を包含する、ヘマトコッカス・ブルビアリスのアスタキサンチン生産を促進させる方法。

【請求項2】前記温度ストレスを加える工程と同時に、その前、および／またはその後に、活性酸素生成物質および炭素源を培養基に添加する工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】請求項1又は請求項2に記載の方法によって得られたヘマトコッカス・ブルビアリスからアスタキサンチンを採取することを包含する、アスタキサンチンの製造方法。

【請求項4】前記温度ストレスが、ヘマトコッカス・ブルビアリスの至適生育温度より10～15℃の範囲で高い温度である、請求項1～3に記載の方法。